

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04807

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスと炎症と過栄養による肝発癌スパイラルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of synergy in hepatocarcinogenesis by hepatitis B virus, inflammation and hypernutrition

研究代表者

小池 和彦 (KOIKE, KAZUHIKO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80240703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染において、cccDNA mini-chromosomeが長期に産生されるが、この過程においてHBV-RNAが生物学的活性をもち病原性に関与することを明らかにした。DExH-box helicase 9 (DXH9)がHBVからの環状RNA生成とHBVタンパクレベルを制御しており、これがHBV持続感染の一つのkey moleculeである。さらに、HBV-cccDNAの排除を達成するために、排除作用をもつ物質のスクリーニングを行った結果、nitazoxanideがHBx-DBB1の相互作用を阻害することを発見した。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) infection can lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Episomal viral covalently closed circular DNA (cccDNA) minichromosomes and transcripts from cccDNA continue to be expressed over the long term. We showed that the host protein DExH-box helicase 9 (DXH9) is associated with viral RNAs. We also showed that viral-derived circular RNA is produced during HBV replication, and the amount is increased by knockdown of the DXH9 protein, which, in turn, results in decreased viral protein levels but does not affect the levels of HBV DNA. In addition, through a comprehensive compound screen using a newly constructed split luciferase system, we showed that nitazoxanide (NTZ) efficiently inhibits the HBx-DBB1 interaction. NTZ significantly restores Smc5 protein levels and suppresses viral transcription and viral protein production in the HBV minicircle system, in in vitro HBV replicating models, and in human primary hepatocytes naturally infected with HBV.

研究分野：内科学

キーワード：肝癌 B型肝炎 炎症 ウイルス 肥満

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染においては高率に肝細胞癌 (肝癌) を合併するが、その発癌の分子医学的機序は充分には解明されていない。我々は以前に、マウスをモデルとして HBV の HBx タンパクに肝発癌作用があることを示し (**Nature 1991**)、HBV 関連肝発癌におけるウイルス因子の重要性を示してきた。しかし、臨床的観察からは B 型肝炎肝発癌においても炎症因子は重要であり、かつ最近では過栄養 (肥満) 因子による発癌促進も示唆されてきている。

2. 研究の目的

炎症により誘発され悪性腫瘍を誘発することが示されている activation-induced cytidine deaminase (AID) 遺伝子を用い、B 型肝炎肝発癌におけるウイルス因子と炎症因子の競合と相互作用について検討し、B 型肝炎における肝癌のイニシエーション、肝癌の進展における炎症性サイトカインと過栄養の役割を、我々が確立した炎症と過栄養 (肥満) による肝発癌マウスモデル (**Cell 2013, Cancer Cell 2014**) を用いて明らかにすることとした。また、我々は、肝臓に豊富に存在する microRNA、miR122 の肝癌における減少が肝腫瘍の悪性化と関連していることを示している (**Nature Commun 2011**)。肝発癌モデルである HBx マウスを用いて、B 型肝炎肝発癌における microRNA を巻き込んだウイルスと炎症と過栄養の役割と相互作用について明らかにする。

3. 研究の方法

HBV 関連肝発癌モデルである HBx 遺伝子 Tg マウスを中心として用いて 3 年間の研究を行なう予定である。このマウスでは低レベルの HBx タンパクを肝臓で発現しており、組織学的な炎症の不在の下に前癌病変を経て肝細胞癌 (肝癌) を発生する。このウイルス肝発癌モデルマウスに、①肝特

異的 AID 遺伝子発現マウスとのかけあわせ、②マウス AID 遺伝子組替えアデノウイルスの接種、③持続的肝障害を起こす MUP-uPA マウスを掛け合わせ、そこへ HFD あるいは LFD を与え、細胞遺伝子傷害を促進させ、肝発癌におけるウイルス因子と炎症、過栄養 (肥満) との相互作用、相加・相乗作用について解析する。解析は、①肝臓内細胞遺伝子発現・シグナリングに対する 3 者の作用の解析、②microRNA を含む肝細胞遺伝子発現の包括的解析、③肝病変の表現型 (肝癌発生、肝脂肪化、DNA 傷害等) の解析、④得られた解析データの B 型慢性肝炎患者肝における確認の 4 つの部分からなる。

4. 研究成果

(1) 炎症により誘発され悪性腫瘍を誘発することが示されている AID 遺伝子を用い、B 型肝炎肝発癌におけるウイルス因子と炎症因子の競合と相互作用について検討し、(2) B 型肝炎における肝癌のイニシエーション、肝癌の進展における炎症性サイトカインと過栄養の役割を、我々が確立した炎症と過栄養 (肥満) による肝発癌マウスモデルを用いて明らかにすることとした。解析は、①酸化ストレス産生に対する両者の作用の解析、②microRNA を含む肝細胞遺伝子発現の包括的解析、③得られた解析データの B 型慢性肝炎患者肝における確認である。H28 年度は、HBV-X 遺伝子発現マウスと肝特異的 AID 遺伝子 KO マウスとの掛け合わせで得られたマウス strain HBX-Tg/AID^{-/-} の解析を継続した。HBX-Tg/AID^{+/+} と比較して、10 か月齢の HBX-Tg/AID^{-/-} における肝発癌頻度は減少していた。しかし、統計学的有意差が認められなかった。

そこで、以下の検討を加えることにした。我々は以前に、マウスをモデルとして HBV

の HBx タンパクに肝発癌作用があることを示し、HBV 関連肝発癌におけるウイルス因子の重要性を示してきた。しかし、臨床的観察からは B 型肝炎肝発癌においても炎症因子は重要であり、かつ最近では過栄養（肥満）因子による発癌促進も示唆されてきている。本研究においては、以下の成果を挙げることができた。（1）HBV 持続感染において、cccDNA mini-chromosome が長期に産生されるが、この過程において HBV-RNA が生物学的活性をもち病原性に関与することを明らかにした。すなわち、DExH-box helicase 9 (DHX9) が HBV からの環状 RNA 生成と HBV タンパクレベルを制御しており、これが HBV 持続感染の一つの key molecule である (Sekiba K, Koike K, et al., *Oncotarget* 2018 in press.)。 (2) HBx タンパクと damage-binding protein 1 (DDB1) の相互作用を通じ、structural maintenance of chromosome (Smc) 5/6 の分解促進を介して cccDNA からの転写を促進することを明らかにした。さらに、HBV-cccDNA の排除を達成するために、排除作用をもつ物質のスクリーニングを行なった結果、nitazoxanide が HBx-DDB1 の相互作用を阻害することを発見した。nitazoxanide は、他剤との併用等によって HBV-cccDNA の排除を起こす可能性がある (Sekiba K, Koike K, et al., submitted)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 60 件) スペースがないため 27 編のみ記載した。

- 1) Enooku K, Kondo M, Fujiwara N, Sasako T, Shibahara J, Kado A, Okushin K, Fujinaga H, Tsutsumi T, Nakagomi R, Minami T, Sato M, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Tateishi R, Ueki K, Ikeda H, Yoshida H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Kadowaki T, Fukayama M, Koike K. Hepatic IRS1 and

β -catenin expression is associated with histological progression and overt diabetes emergence in NAFLD patients. **J**

Gastroenterol 2018 May 10. doi:

10.1007/s00535-018-1472-0. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29749571.

- 2) Matsui C, Deng L, Minami N, Abe T, Koike K, Shoji I. Hepatitis C virus NS5A protein promotes the lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via chaperone-mediated autophagy. **J Virol** 2018 Apr 25. pii: JVI.00639-18. doi:10.1128/JVI.00639-18. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29695419.
- 3) Iwasa M, Karino Y, Kawaguchi T, Nakanishi H, Miyaaki H, Shiraki M, Nakajima T, Sawada Y, Yoshiji H, Okita K, Koike K. Relationship of muscle cramps to quality of life and sleep disturbance in patients with chronic liver diseases: a nationwide study. **Liver Int** 2018 Mar 27. doi: 10.1111/liv.13745. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29582541.
- 4) Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, Kudo Y, Hayata Y, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi R, Hikiba Y, Misumi K, Tanaka M, Hayashi A, Shibahara J, Fukayama M, Arita J, Hasegawa K, Hirschfield H, Hoshida Y, Hirata Y, Otsuka M, Tateishi R, Koike K. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity. **Gut** 2018 Feb 6. pii: gutjnl-2017-315193. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315193. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29437870.
- 5) Ikeda H, Kobayashi M, Kumada H, Enooku K, Koike K, Kurano M, Sato M, Nojiri T, Kobayashi T, Ohkawa R, Shimamoto S, Igarashi K, Aoki J, Yatomi Y. ANNALS

- EXPRESS: Performance of autotaxin as a serum marker of liver fibrosis. **Ann Clin Biochem** 2017 Nov 1:4563217741509. doi: 10.1177/0004563217741509. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29065699.
- 6) Sawai H, Nishida N, Khor SS, Honda M, Sugiyama M, Baba N, Yamada K, Sawada N, Tsugane S, Koike K, Kondo Y, Yatsushashi H, Nagaoka S, Taketomi A, Fukai M, Kurosaki M, Izumi N, Kang JH, Murata K, Hino K, Nishina S, Matsumoto A, Tanaka E, Sakamoto N, Ogawa K, Yamamoto K, Tamori A, Yokosuka O, Kanda T, Sakaida I, Itoh Y, Eguchi Y, Oeda S, Mochida S, Yuen MF, Seto WK, Poovorawan Y, Posuwan N, Mizokami M, Tokunaga K. Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. **Sci Rep** 2018 May 21;8(1):7958. doi:10.1038/s41598-018-26217-7. PubMed PMID: 29784950.
- 7) Shimizu K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Kobayashi T, Endo M, Sato M, Gotoh H, Iwai T, Tateishi R, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Eradication of hepatitis C virus is associated with the attenuation of steatosis as evaluated using a controlled attenuation parameter. **Sci Rep** 2018 May 18;8(1):7845. doi:10.1038/s41598-018-26293-9. PubMed PMID: 29777191.
- 8) Sekiba K, Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yamagami M, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels. **Oncotarget** 2018 Apr 20;9(30):20953-20964. doi: 10.18632/oncotarget.25104. eCollection 2018 Apr 20. PubMed PMID: 29765512; PubMed Central PMCID: PMC5940377.
- 9) Hikita H, Sato M, Sato M, Soroida Y, Kobayashi T, Gotoh H, Iwai T, Nakagomi R, Tateishi R, Komuro T, Sone S, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Disappearance of Perihepatic Lymph Node Enlargement after hepatitis C viral eradication with direct acting antivirals. **J Viral Hepat** 2018 Apr;25(4):329-334. doi: 10.1111/jvh.12819. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29091333.
- 10) Mikoshiba N, Yamamoto-Mitani N, Ohki T, Asaoka Y, Yamaguchi H, Obi S, Sato K, Koike K, Miyashita M. A simple home-based self-monitoring tool for early detection of hand-foot syndrome in cancer patients. **Jpn J Clin Oncol** 46;2016:973-978. PubMed PMID: 27511991.
- 11) Yamada N, Sugiyama R, Nitta S, Murayama A, Kobayashi M, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Resistance mutations of hepatitis B virus in entecavir-refractory patients. **Hepatol Commun** 2017 Mar 9;1(2):110-121. doi: 10.1002/hep4.1022. eCollection 2017 Apr. PubMed PMID: 29404449; PubMed Central PMCID: PMC5721430.
- 12) Hiramine Y, Uojima H, Nakanishi H, Hiramatsu A, Iwamoto T, Kimura M, Kawaratani H, Terai S, Yoshiji H, Uto H, Sakaida I, Izumi N, Okita K, Koike K. Response criteria of tolcapitan for the treatment of hepatic edema. **J Gastroenterol** 2018 Feb;53(2):258-268. doi: 10.1007/s00535-017-1366-6. PubMed PMID: 28664229.

- 13) Koike K, Suyama K, Ito H, Itoh H, Sugiura W. A randomized prospective study showing the non-inferiority of tenofovir to entecavir in treatment-naïve chronic hepatitis B patients. **Hepato Res** 2018 Jan;48(1):59-68. doi: 10.1111/hepr.12902. PubMed PMID: 28374496.
- 14) Hirano J, Okamoto T, Sugiura Y, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Fukuhara T, Sasai M, Tougan T, Matsunaga Y, Yamashita K, Sakai Y, Yamamoto M, Horii T, Standley DM, Moriishi K, Moriya K, Koike K, Matsuura Y. Characterization of SPP inhibitors suppressing propagation of HCV and protozoa. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2017 Dec 12;114(50):E10782-E10791. PubMed PMID: 29187532.
- 15) Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Yamagami M, Ishibashi R, Sekiba K, Suzuki T, Ohno M, Yamashita Y, Abe T, Masuzaki R, Ikenoue T, Koike K. RASAL1 is a potent regulator of hepatic stellate cell activity and liver fibrosis. **Oncotarget** 2017 May 4;8(39):64840-64852. doi: 10.18632/oncotarget.17609. eCollection 2017 Sep 12. PMID:29029395
- 16) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Matsui H, Horiguchi H, Fushimi K, Koike K. Mortality and hemorrhagic complications associated with radiofrequency ablation for treatment of hepatocellular carcinoma in patients on hemodialysis for end-stage renal disease: a nationwide survey. **J Gastroenterol Hepatol** 2017 Nov;32(11):1873-1878. doi:
- 17) Soroida Y, Endo M, Sato M, Kobayashi T, Hikita H, Sato M, Gotoh H, Iwai T, Sone S, Sasano T, Sumi Y, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Ultrasound evaluation of liver stiffness: accuracy of ultrasound imaging for the prediction of liver cirrhosis as evaluated using a liver stiffness measurement. **J Med Dent Sci** 2017;64(2-3):27-34. doi: 10.11480/jmds.640301. PubMed PMID: 28966288.
- 18) Kumada H, Koike K, Suyama K, Ito H, Itoh H, Sugiura W. Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy for chronic hepatitis B patients who failed other nucleos(t)ide analogues. **Hepato Res** 2017 Sep;47(10):1032-1041. doi:10.1111/hepr.12842. PubMed PMID: 27862721.
- 19) Nakagawa H, Suzuki N, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Kinoshita H, Ihara S, Uchino K, Nishikawa Y, Ijichi H, Otsuka M, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Tateishi K, Koike K. Biliary epithelial injury-induced regenerative response by IL-33 promotes cholangiocarcinogenesis from peribiliary glands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2017 May 9;114(19):E3806-E3815. doi: 10.1073/pnas.1619416114. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28439013.
- 20) Sekiba K, Yamagami M, Otsuka M, Suzuki T, Kishikawa T, Ishibashi R, Ohno M, Sato M, Koike K. Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system. **Biochem Biophys Res Commun** 2017;486(2):521-525. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.076. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28322797.
- 21) Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Yamamoto S, Tamura T, Mori H, Sato A, Uemura K, Fauzyah Y, Kurihara T, Suda T, Nishio A,

- Hmwe SS, Okamoto T, Tatsumi T, Takehara T, Chayama K, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. **PLoS Pathog** 2017 May 11;13(5):e1006374. doi: 10.1371/journal.ppat.1006374. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28494029.
- 22) Shiraki M, Shimizu M, Moriwaki H, Okita K, Koike K. The carnitine dynamics and their effects on hyperammonemia in cirrhotic Japanese patients. **Hepatol Res** 2017 Mar;47(4):321-327. doi: 10.1111/hepr.12750. PubMed PMID: 27254133.
- 23) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Yoshida H, Fushimi K, Koike K. The ADOPT-LC Score: A novel predictive index of in-hospital mortality of cirrhotic patients following surgical procedures based on a national survey. **Hepatol Res** 2017 Mar;47(3):E35-E43. doi: 10.1111/hepr.12719. Epub 2016 May 6. PubMed PMID: 27062144.
- 24) Tsutsumi T, Okushin K, Enooku K, Fujinaga H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Aizaki H, Suzuki T, Matsuura Y, Koike K. Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus interferes with toll-like receptor signaling and suppresses the interferon response in mouse liver. **PLoS One** 2017 Jan 20;12(1):e0170461. doi:10.1371/journal.pone.0170461. PubMed PMID: 28107512.
- 25) Sakamoto M, Tsujikawa H, Effendi K, Ojima H, Harada K, Zen Y, Kondo F, Nakano M, Kage M, Sumida Y, Hashimoto E, Yamada G, Okanoue T, Koike K. Pathological findings of nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease. **Pathol Int** 2017 Jan;67(1):1-7. doi: 10.1111/pin.12485. Epub 2016 Dec 20. PubMed PMID: 27995687.
- 26) Ogishi M, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Delineation of autoantibody repertoire through differential proteogenomics in hepatitis C virus-induced cryoglobulinemia. **Sci Rep** 2016 Jul 12;6:29532. doi: 10.1038/srep29532. PubMed PMID: 27403724.
- 27) Okushin K, Tsutsumi T, Enooku K, Fujinaga H, Kado A, Shibahara J, Fukayama M, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K. The intrahepatic expression levels of bile acid transporters are inversely correlated with the histological progression of nonalcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol** 2016;51(8):808-818. doi: 10.1007/s00535-015-1148-y. PubMed PMID: 26601667.

[学会発表] (計 10 件) スペースがないためリストは割愛する。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：

<http://gastro.m.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池和彦 (KOIKE, Kazuhiko)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80240703

(2) 研究分担者

森屋恭爾 (MORIYA, Kyoji)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00272550

(3) 研究分担者

堤 武也 (TSUTSUMI, Takeya)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00726739